

DETERMINACIÓN DE *Listeria monocytogenes* EN QUESOS FRESCOS DE PRODUCCIÓN ARTESANAL QUE SE EXPENDEN EN LOS MERCADOS DEL DISTRITO DE ICA, ENERO - MARZO 2003

Ana Espinoza M¹, Magali De La Torre B¹, Marianella Salinas F¹, Víctor Sánchez P²

RESUMEN

Objetivo: Determinar la presencia de *L. monocytogenes* en quesos frescos de producción artesanal expendidos en los mercados de Ica durante el periodo enero – marzo de 2003. **Material y Métodos:** De la totalidad de los puestos que expenden queso fresco artesanal en los mercados Santo Domingo, Alejandro Toledo, San Antonio y Modelo, se evaluaron 74 muestras teniendo como unidad muestral 200 g según la Norma Técnica Peruana ISO 28329-1. El procesamiento, aislamiento e identificación se realizó de acuerdo con la metodología recomendada por el manual de bacteriología analítica de la Food and Drug Administration (FDA). **Resultados:** De las 74 muestras, 3 (4,05%) presentaban *L. monocytogenes*, y de ellas, una muestra correspondió al mercado Alejandro Toledo y 2 muestras al mercado Modelo. Se logró aislar 28 cepas de las cuales 6 (21,4%) correspondieron a *L. monocytogenes*, y 22 (78,6%) a otros microorganismos como *Lactococcus lactis* ss *lactis*, *Enterococcus* spp. y *Bacillus* spp. No se logró aislar *L. monocytogenes* en los mercados Santo Domingo y San Antonio; sin embargo, en el mercado Alejandro Toledo se aisló una cepa y en el mercado Modelo, se aislaron 5 cepas, lo cual demuestra la presencia significativa de *L. monocytogenes* sólo en el mercado Modelo. **Conclusiones:** Existe *L. monocytogenes* en quesos frescos de producción artesanal, representando un riesgo potencial para la población consumidora.

Palabras clave: Listeriosis; Queso; Intoxicación alimentaria; Peru. (fuente: BIREME).

ABSTRACT

Objective: To determine the presence of *L. monocytogenes* in home made non-pasteurized cheese sold in Ica district markets during the period from January to March, 2003. **Material and Methods:** 74 samples were assessed from all the vendor places in Santo Domingo, Alejandro Toledo, San Antonio, and Modelo markets, and the sampling unit was 200 g, according to the Peruvian technical Specification ISO 28329-1. Processing, isolation, and identification were performed according the methodology recommended by analytical bacteriology manual edited by the US Food and Drug Administration (FDA). **Results:** Of the 74 samples, 3 (4.05%) had *L. monocytogenes*, one of them from Alejandro Toledo market and the other two were from Modelo market. Overall, 28 bacterial strains were isolated, 6 (21.4%) of them were identified as *L. monocytogenes*, and 22 (78.6%) had other microorganisms, such as *Lactococcus* ss *lactis*, *Enterococcus* spp., and *Bacillus* spp. No *L. monocytogenes* strains were isolated from Santo Domingo and San Antonio markets; however, in Alejandro Toledo market one strain was found, and in Modelo market 5 strains were isolated, which proves the significant presence of *L. monocytogenes* only in Modelo market. **Conclusions:** There is presence of *L. monocytogenes* in home made non-pasteurized cheese, which represents a potential risk for the consumer population.

Key words: Listeriosis; Cheese; Food poisoning; Peru. (source: BIREME).

INTRODUCCIÓN

Listeria monocytogenes es un bacilo corto, intracelular, que se encuentra ampliamente distribuido en la naturaleza¹⁻⁹. Este microorganismo es causante de la listeriosis siendo los grupos con más alto riesgo las mujeres embarazadas (en mayor porcentaje), recién nacidos, ancianos, pacientes con enfermedades neoplásicas y personas que tienen el sistema

inmunitario deficiente (pacientes con VIH, pacientes con órganos transplantados, etc.)^{2-4,6,9,10}.

Esta bacteria es una de las patógenas más importantes de origen alimentario, dado que resiste diversas condiciones ambientales, como pH bajo, altas concentraciones de sal y, sobre todo, tiene la capacidad de sobrevivir a temperaturas de refrigeración (2-4 °C) y tratamientos insatisfactorios de pasteurización, logran-

¹ Facultad de Ciencias de la Universidad Nacional «San Luis Gonzaga» Ica, Perú.

² Laboratorio de Microbiología, Centro Nacional de Alimentación y Nutrición, Instituto Nacional de Salud. Lima. Perú.

do que se constituya en una seria amenaza a la seguridad de la industria alimentaria^{1,2,5-7}.

Se tiene informes sobre casos esporádicos y epidemias de listeriosis, como el ocurrido en Canadá durante los años 1980 y 1981, debido al consumo de ensaladas de col abonadas con estiércol de oveja; posteriormente, se registró en Massachussets, California y Francia en los años 1983, 1985 y 1995, respectivamente, ocasionadas por el consumo de leches pasteurizadas, quesos estilo mexicano y quesos frescos elaborados con leche cruda^{1,2,4,5,7,9,11}. Datos más recientes señalan que casi mil personas se infectan por año y que la cuarta parte de ellas fallece a causa de la infección¹⁻³. En el Perú no existen trabajos publicados sobre *Listeria monocytogenes* en quesos ni otros tipos de alimentos.

El queso elaborado artesanalmente es uno de los productos lácteos que ofrece condiciones favorables para el crecimiento de *Listeria*^{1,2,4,12}, porque es elaborado a partir de leche cruda sin pasteurización, inadecuadas prácticas de manufactura, que sumados a la alta humedad y al hecho de no estar sujetos a controles de almacenamiento, distribución y expendio, se convierten en un vehículo potencial de transmisión para *L. monocytogenes* y otros microorganismos patógenos^{4,13}.

En la ciudad de Ica, la forma de expendio de este producto no es la adecuada, además, el clima cálido influye en la reproducción de los microorganismos patógenos que son el origen de infecciones alimentarias. Por ello, el objetivo del presente estudio es determinar la presencia de *L. monocytogenes* en quesos frescos de producción artesanal que se expenden en los mercados con mayor afluencia en la ciudad de Ica, Perú.

MATERIAL Y MÉTODOS

Estudio observacional de diseño descriptivo transversal. Se recolectaron 74 muestras de queso fresco de leche de vaca elaborados artesanalmente, de los puestos que comercializan este producto en los cuatro principales mercados (los de mayor afluencia de público) del distrito de Ica: Santo Domingo, Alejandro Toledo, San Antonio y Modelo durante los meses de enero a marzo de 2003. El muestreo se realizó según la Norma Técnica Peruana NTP ISO 2859-1¹⁴; la unidad muestral fue de 200 g de queso, colectado y etiquetado en bolsas de polietileno y conservado en cadena de frío para su traslado hacia el laboratorio. El procesamiento de la muestra se realizó en el Laboratorio de Microbiología del Centro Nacional de Alimentación y Nutrición – Instituto Nacional de Salud, de acuerdo con

el manual de bacteriología analítica de la *Food and Drug Administration* (FDA)⁹.

Preenriquecimiento: Se tomó 25 g de cada muestra de queso, con ayuda de un cuchillo y una bandeja estériles, luego se homogeneizó con 225 mL de caldo de Enriquecimiento Base Listeria (LEB) (Merck®), en un agitador *Stomacher Seward*® durante un minuto; posteriormente, se incubó a 30 °C durante cuatro horas^{9,14}.

Enriquecimiento: Después de la incubación, se adicionó 0,9 mL del suplemento selectivo para caldo LEB a cada una de las muestras, y se continuó con la incubación a 30 °C hasta completar las 24 y 48 horas^{9,15}.

Aislamiento: A partir del caldo LEB incubado por 24 y 48 horas, se sembró en agar *Oxford y Palcam* (Merck)® por estría y agotamiento, luego se incubó a 35 °C durante 24 y 48 horas^{9,15}.

Identificación: Se examinó macroscópicamente a las colonias que crecieron en los medios selectivos *Oxford* y *Palcam*, y que presentaron las características principales como degradar la esculina, ser pequeñas y presentar borde entero y depresión central^{3,4,7,11}. También se realizó un estudio microscópico en muestras coloreadas con la técnica de Gram en la que se observaron cocobacilos Gram positivos. Las colonias aisladas se sembraron en TSAYE (agar tripticasa soya-extracto de levadura 0,6%) y TSBYE (caldo tripticasa soya-extracto de levadura 0,6%) para la realización de las pruebas bioquímicas^{1,3, 7,9,15,16}.

Pruebas bioquímicas para diferenciar el género: Se realizaron las siguientes pruebas bioquímicas: catalasa, oxidasa, motilidad, ureasa, reducción de nitrato y rojo de metilo–Voges Proskauer^{1,4, 9, 15}.

Pruebas bioquímicas para diferenciar las especies de Listeria: Se usaron: el agar cromogénico para *Listeria*, la prueba del CAMP (*Christie-Atring-Munch-Peterson*), asimilación de carbohidratos y el sistema de identificación *Api Listeria* marca *BioMérieux*^{®9, 15}. Para el análisis estadístico del presente estudio se tomó en cuenta a los criterios microbiológicos emitidos por la Dirección General de Salud (DIGESA) del Ministerio de Salud del Perú¹⁷.

RESULTADOS

Se evaluaron 74 muestras de queso fresco preparado artesanalmente; analizado según el método de la FDA, se logró aislar 28 colonias con características similares a las del género *Listeria*. Las pruebas

confirmatorias evidenciaron que 6 (21,4%) presentaban características compatibles con *L. monocytogenes*. Asimismo, 22 (78,6%) correspondieron a otros microorganismos, de las cuales 6 (21,4%) se identificaron como *Lactococcus lactis* ss *lactis*, 14 (50%) como *Enterococcus* spp. y 2 (7,4%) como *Bacillus* spp.

Finalmente, de 74 muestras de quesos frescos, tres (4,05%) fueron positivas para *L. monocytogenes* y correspondieron a los mercados Alejandro Toledo y Modelo, las muestras positivas para *L. monocytogenes* en dos mercados, de acuerdo con los criterios microbiológicos de calidad e inocuidad para los alimentos y bebidas de consumo humano, que se aplican para leche y derivados según DIGESA, donde el límite permisible por g/mL para *L. monocytogenes* es cero; muestran que existe riesgo para la salud, dado que la existencia de una sola bacteria en condiciones favorables para su reproducción, sumado a la motilidad que presenta a temperatura ambiente^{1,3,9,10,17,18} puede contaminar a los quesos libres de esta bacteria (Tabla 1).

DISCUSIÓN

Luego de analizar las 74 muestras se logró aislar 28 colonias con características similares a las del género *Listeria*, seis de ellas (21,4%) correspondieron a *Listeria* spp. y 22 (78,6%) a otros microorganismos. Estos resultados sugieren que la contaminación se produciría durante la elaboración del queso, probablemente por el uso de leche contaminada¹⁸⁻²¹. La contaminación de leche puede proceder de vacas que padecen mastitis listeriosa asintomática o de muestras de leche de un animal con mastitis subclínica¹⁸; asimismo, los quesos artesanales que son elaborados a partir de estas leches sin pasteurización, y aún los sometidos a este proceso, tienen el riesgo de presentar esta bacteria, debido a que soporta tratamien-

tos térmicos deficientes en tiempo, y por ser intracelulares, tienen la capacidad de protegerse dentro de los glóbulos de grasa; además, los minerales presentes en la leche entera favorecen la supervivencia de este microorganismo¹⁰. Otro tipo de contaminación puede deberse al contacto accidental con heces humanas y de animales o con forraje contaminado^{1,3,6} además de la existencia de condiciones de expendio, almacenamiento y manipuleo no adecuados en los diferentes mercados observados en el muestreo.

De las seis (21,4%) colonias aisladas del género *Listeria* spp., todas correspondieron a la especie *L. monocytogenes*, concordando con los resultados encontrados por Citti et al.¹³, quienes aislaron ésta especie en 2% como única especie, difiriendo de otros^{9,19,24,25} que han reportado otras especies como: *L. seeligeri*, *L. ivanovii*, *L. innocua*, *L. gragy* y *L. welshimeri*. Asimismo, 22 (78,6%) correspondieron a otros microorganismos, de las cuales seis (21,4%) se identificaron como *Lactococcus lactis* ss *lactis*, catorce (50%) como *Enterococcus* spp. y dos (7,4%) como *Bacillus* spp. La presencia de *Lactococcus lactis* ss *lactis* se debe a que este microorganismo forma parte de la flora normal de la leche, lo que no sucede con *Enterococcus* spp. que es un indicador fecal y demuestra la pobre calidad sanitaria de elaboración y manipulación de los quesos tipo artesanal. Se sabe que estos microorganismos producen ácidos orgánicos, peróxido de hidrógeno y bacteriocinas que tienen efectos antagónicos contra *Listeria*, como competencia por nutrientes^{24,25}. Del total de muestras (74) de queso, tres (4,5%) fueron positivas para *L. monocytogenes*, lo cual concuerda con los resultados obtenidos por Bottarelli et al.²³, quienes hallaron 2% de este microorganismo en quesos de corta maduración en Italia; Citti et al.¹³ aislaron 2% de *L. monocytogenes* en muestra de queso blanco tipo llanero en Venezuela; sin embargo, en Portugal hallaron porcentajes más elevados^{19,24}; Villanueva reportó

Tabla 1. Porcentaje y significancia de muestras positivas de queso fresco tipo artesanal para *L. monocytogenes* en los principales mercados de Ica, enero-marzo de 2003.

Mercado	Total	Muestras positivas	
		n	%
Santo Domingo	18	0	0,0
Alejandro Toledo	21	1	4,76
San Antonio	10	0	0,0
Modelo	25	2	8,0
TOTAL	74	3	4,05%

6,34% de quesos frescos contaminados por *L. monocytogenes* en mercados de Lima²⁵; a diferencia de Argentina, donde no se logró aislar *L. monocytogenes* de quesos duros²⁶, sustentando que la supervivencia de este microorganismo está asociada a elevados porcentajes de humedad^{1, 27}.

L. monocytogenes se aisló en 4% del total de muestras de queso fresco tipo artesanal que corresponden a los mercados Alejandro Toledo y Modelo, encontrándose, en este último, la mayor cantidad de muestras positivas (8%), esto se debe a que los quesos son almacenados a temperaturas frescas, junto con otros alimentos como los embutidos, que pueden ocasionar una contaminación cruzada^{28,30}; esto, sumado a la infraestructura que retiene humedad, hace posible la supervivencia de *Listeria*. La ausencia de este microorganismo en quesos de los mercados Santo Domingo y San Antonio, cumple con las normas legales emitidas por la Dirección General de Salud (DIGESA) en cuanto a la tolerancia cero para *L. monocytogenes* por gramo de alimento; sin embargo, presentaron mala calidad higiénico-sanitaria, por que en estos se encontró alta carga de microorganismos indicadores de contaminación fecal como *Enterococcus spp.*, también *Lactococcus lactis* ss *Lactis* y *Bacillus spp.*, que como anteriormente se mencionó ejercen efectos antagónicos para *L. monocytogenes*. Otro factor que pudo haber influido es que muchos de estos quesos se expenden al aire libre en forma ambulatoria, expuestos a la irradiación solar casi directa, lo cual ocasiona la pérdida de humedad y el endurecimiento del producto; condición donde la probabilidad de encontrar este microorganismo es nula²⁶.

El bajo porcentaje hallado de este microorganismo no deja de ser un riesgo para la salud, dado que la existencia de una sola bacteria en condiciones favorables para su reproducción, sumado a la motilidad que presenta a temperatura ambiente^{2,5,6,11,18,31}, puede contaminar a los productos vecinos. Por lo tanto, en el mercado Modelo existe un riesgo potencial para la salud de la población consumidora.

AGRADECIMIENTOS

A los biólogos: Beatriz Consuelo, Elizabeth Salazar, Gloria Estupiñán y Juan José Quispe, del área de microbiología del Centro Nacional de Alimentación y Nutrición del Instituto Nacional de Salud. A las señoritas Miriam Rivera, Mariella Tiburcio y Betty Tejeda por su apoyo en el laboratorio.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. **Axelson F, Sonrin M.** Transia *Listeria*. Technical Handbook. Sweden: Diffchamb AB; 1998.
2. **Bell C, Kyriakides A.** *Listeria*. Una aproximación práctica al microorganismo y su control en los alimentos. España. Acibia; 1998.
3. **Bille J, Rocourt J, Swamirathan B.** *Listeria, Erhysipelotrix, and Kurthia*. In Murray P, Baron EJ, Ptaller MA, Tenover FC, Yolken RH, (eds). Manual of Clinical Microbiology. 7th. ed. Washington DC: American Society for Microbiology Press, 1999. p. 346-56.
4. **Donnelly CW, Brackett R, Doores S, Lee W, Lovett J.** *Listeria*. In: Vanderzant C, Splittstooser DF, (eds). Compendium of methods for the microbiological examination of foods. 3rd ed. Washington DC: American Public Health Association. 1992. p. 637-63.
5. **Farber JM, Peterkin PI.** *Listeria monocytogenes*, a food-borne pathogen. Microbiol Review 1991; 55(3): 476-511.
6. **Center for Food Safety and Applied Nutrition.** Preventing food borne listeriosis. [en línea]. Estados Unidos. Food and Drug Administration; 1992. [fecha de acceso 15 de Abril del 2003], URL disponible en: <http://vm.cfsan.fda.gov/~mow/FSISLIST.html>.
7. **Vasquez-Boland JA, Kuhn M, Berche P, Chakraborty T, Dominguez-Bernal G, Gobel W, et al.** *Listeria*, pathogenesis and molecular virulence determinants. Clin Microbiol Rev 2001; 14(3): 584-640.
8. **Oteo J, Alos J.** *Listeria* y Listeriosis. [en línea]. España. Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica; 2002. [fecha de acceso 05 de mayo de 2003], URL disponible en: http://www.seimc.org/control/revi_Bacte/listeria.htm.
9. **Hitchins AD.** *Listeria monocytogenes*. In Food and Drug Administration (eds). Bacteriological Analytical Manual. 8th ed. Arlington: AOAC International, 1995; pp. 10.01-11.08.
10. **Watson D.** Revisiones sobre ciencia y tecnología de los alimentos. Volumen 1: Higiene y Seguridad Alimentaria. Zaragoza: Acibia; 1994.
11. **Temple ME, Nahata MC.** Treatment of listeriosis. Ann Pharmacother 2000; 34(5): 656-61.
12. **Porto E, Eiroa MN.** Occurrence of *Listeria monocytogenes* in vegetables. Dairy Food Environ Sanit 2001; 21: 282-6.

13. **Citti R, Scaramelli A, Gonzalez I.** Aislamiento de *L. monocytogenes* en muestras de queso blanco duro tipo llanero del distrito sanitario Uno del estado Aragua, Venezuela. Rev Fac Cs Vets 1999; 40 (2): 101-10.
14. **Instituto Nacional de Defensa de la Competencia y de Protección Intelectual.** Norma Técnica Peruana NTP-ISO 2859-1. Procedimientos de muestreo para inspección por atributos. Parte I: Planes de muestreo clasificados por nivel de calidad aceptable (NCA) para inspección lote por lote. Lima: INDECOPI; 1999
15. **Association Francaises de Normalisation.** Detection of *Listeria monocytogenes* – Routine method. [En Línea]. Francia. AFNOR 1993. [Fecha de acceso 08 de Abril de 2003], disponible en: <http://www.Afnor.fr>.
16. **Food and Drug Administration. Center for Food Safety and Applied Nutrition.** Bacteriological Analytical Manual on line Reagents Index. [en línea]. Estados Unidos. FDA; 2001. [fecha de acceso 15 de Abril de 2003], URL disponible en: <http://vm.cfsan.fda.gov/~ebam/bam-ri.html>.
17. **Resolución Ministerial Nº 615 – 2003 – S.A/DM del 28 de Junio del 2003.** Criterios microbiológicos de la calidad sanitaria e inocuidad de los alimentos y bebidas de consumo humano.
18. **Laciar A, Vaca L, De Centobi ON.** *Listeria spp.* en alimentos de origen animal. Rev Argent Microbiol 1999; 31(1): 25-30.
19. **Brisabois A, Lafarge V, Brovillaud A, De Buyser M, Collette C, Garin-Bastuji B, et al.** Pathogenic organisms in milk and milk products: the situation of France and in Europe. Rev Sci Tech 1997;16(2): 452-71.
20. **Guerra M, Bernardo F.** *Listeria spp.* in raw milk and traditional Portuguese cheeses from Alentejo [resumen]. In: World congress on Food Hygiene. Portugal; 1997.
21. **Catão R, Ceballos B.** *Listeria spp.*, coliformes totais e fecháis e *E. coli* no leite cru e pasteurizado de uma industria de laticínios, no estado da Paraíba (Brazil). Ciênc Tecnol Aliment 2001; 21(3): 281-87.
22. **Waak E, Tham W, Danielsson-Tham ML.** Prevalence and fingerprinting of *Listeria monocytogenes* strains isolated from raw whole milk in farm bulk tanks and dairy plant receiving tank. App Environ Microbiol 2002; 68(7): 3366 -70.
23. **Bottarelli A, Bonardi S, Bentley S.** Presence of *Listeria spp.* in short-ripened cheeses. Annali Della Facolta Di Medicina Veterinaria Di Parma 1999; 19: 181-88.
24. **Guerra M, Bernardo F.** Caracterização de efeitos inibidores *Listeria monocytogenes* Scott A, produzidos pela microflora de maturação de queijos do Alentejo. Rev Port Cien Vet 2001; 96(538): 65-9.
25. **Villanueva E.** *Listeria monocytogenes* en quesos frescos en 5 mercados de expendio en Lima. [Tesis para optar el Título Profesional de Biólogo] Lima. Facultad de Ciencias Biológicas-Universidad Nacional Mayor de San Marcos; 2000.
26. **Okovic C, Sarquis S, Martinez B, Michanie S.** *Listeria monocytogenes* en quesos. Método rápido de hibridación de ADN. En: IV Congreso Latinoamericano de Microbiología e Higiene. Argentina. 1996.
27. **Margolles A, Mayo B, de los Reyes-Gavilan CG.** Polymorphism of *Listeria monocytogenes* and *Listeria innocua* strains isolated from short ripened cheeses. J Appl Microbiol 1998; 84 (2): 255- 62.
28. **Menéndez S, Godinez M, Rodriguez-Otero JL, Centeno JA.** Removal of *Listeria spp.* in a cheeses factory. J Food Safety 1997; 17:133-9.
29. **Furrer B, Candrian U, Hoefelein C, Luethy J.** Detection and identification of *Listeria monocytogenes* in cooked sausage products and in milk by in vitro amplification of haemolysin gene fragments. J Appl Bacteriol 1991; 70(5):372-9.
30. **Pimenta FC, Furlanetto SMP, Mayer LW, Timenetsky J, Azevedo dos Santos MA.** Molecular characterization of *Listeria monocytogenes* isolated from foods. Rev Microbiol 1999; 30(4): 356-61.
31. **Kihm D, Leyer GJ, An GH, Jhonson EA.** Sensitization of heat- treated *Listeria monocytogenes* to added lysozyme in milk. Appl Environ Microbiol 1994; 60(10): 3851-61.

Correspondencia: Magali De La Torre B. Universidad Nacional San Luis Gonzaga de Ica.

Dirección: Av. Fernando León Arechua S/N B - 02, Ica, Perú.

Teléfono: (056) 215170/ (01) 93032428.

Correo electrónico: lisbeth69@hotmail.com